

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 2000002675 A

(43) Date of publication of application: 07 . 01 . 00

(51) Int. Cl

G01N 25/00
G01N 21/41
G01N 27/447

(21) Application number: 10181587

(22) Date of filing: 12 . 06 . 98

(71) Applicant: ASAHI CHEM IND CO LTD

(72) Inventor: SHIMOIDE KOJI
KUROKAWA HIROSHI

(54) CAPILLARY PHOTOTHERMAL CONVERSION ANALYZER

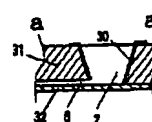
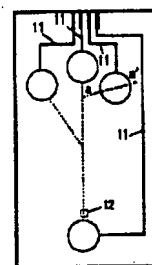
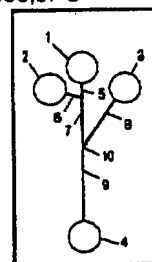
(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To analyze a component in a trace amount while the flow rate is controlled with high accuracy and continuously with a simple, small and low-cost analyzer by a liquid sample inside a capillary (a groove) formed on a chip is changed into an electroosmotic flow, it is irradiated with exciting light and a change in a physical quantity due to the partial temperature change of the liquid sample is measured.

SOLUTION: Fine grooves 5 to 9 are formed, by an etching work or the like, on the surface of a chip-material flat board 31 such as a glass flat board, a resin flat board or the like. A cover plate 32 is bonded to the flat board 31 which contains the grooves 5 to 9, and a chip which is 12 cm long, 8 cm wide and 3 mm thick is formed. Then, a buffer solution is dropped into a liquid reservoir 4, and the grooves 5 to 9 are filled wholly with the buffer solution. After that, a reagent is dropped into liquid reservoirs 2, 3, and a specimen is dropped into a liquid reservoir 1. The chip is set on an inverted microscope, a high voltage is applied to electrodes 30 in the liquid reservoirs 1 to 3, an electroosmotic flow is generated to the liquid reservoir 4 from the liquid reservoirs 1 to 3, the specimen and

the reagent are mixed and reacted in the grooves 5 to 9 so as to be guided to a detection part 12, a laser beam for excitation is radiated, and the specimen is detected by a photothermal conversion method.

COPYRIGHT: (C)2000,JPO



(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-2675

(P2000-2675A)

(43)公開日 平成12年1月7日(2000.1.7)

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

G 0 1 N 25/00
21/41
27/447

G 0 1 N 25/00
21/41
27/26

Z 2 G 0 4 0
Z 2 G 0 5 9
3 3 1 E

審査請求 未請求 請求項の数5 F D (全 11 頁)

(21)出願番号

特願平10-181587

(22)出願日

平成10年6月12日(1998.6.12)

(71)出願人 000000033

旭化成工業株式会社

大阪府大阪市北区堂島浜1丁目2番6号

(72)発明者 下出 浩治

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(72)発明者 黒川 祥

静岡県富士市鮫島2番地の1 旭化成工業株式会社内

(74)代理人 100066980

弁理士 森 哲也 (外3名)

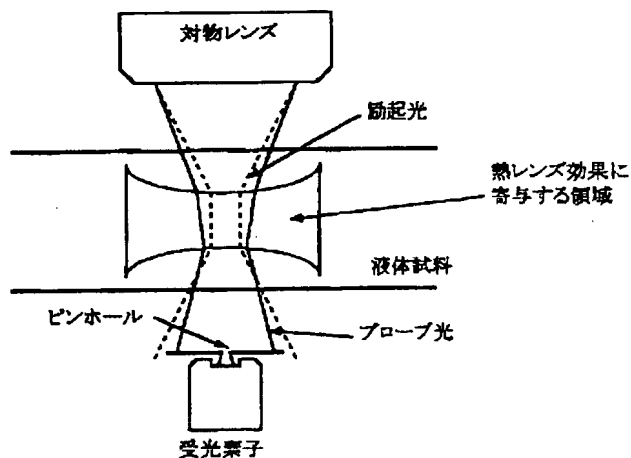
最終頁に続く

(54)【発明の名称】 キャピラリー光熱変換分析装置

(57)【要約】

【課題】即応的で、高精度かつ連続的な変化も可能な流量制御が行え、耐久性、静粛性が高く、かつキャピラリーチップ（溝が刻まれたチップ）中の流路に、光路長を長く取るための複雑な構造をすることなく、また、安価な小型の光学系の検出装置で、微量成分を分析できる分析装置を提供する。

【解決手段】キャピラリー内に液体および液体試料を送液し、前記液体試料を分析するキャピラリー分析装置であって、前記送液は、前記液体および液体試料に電圧を印加して行い、前記分析は、該液体試料成分中、または、液体試料中成分と液体中の構成成分との反応生成物に励起光を照射して、キャピラリー内の部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換分析法により行う、ことを特徴とするキャピラリー分析装置。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 キャピラリー内に液体および液体試料を送液し、前記液体試料を分析するキャピラリー分析装置であって、前記送液は、前記液体および液体試料に電圧を印加して行い、前記分析は、該液体試料成分中、または、液体試料中成分と液体中の構成成分との反応生成物に励起光を照射して、キャピラリー内の部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換分析法により行う、ことを特徴とするキャピラリー分析装置。

【請求項2】 一对の板状部材を備え、少なくとも一方の板状部材の表面に液体が流れる溝が形成され、これら板状部材が溝を内側に張り合わされてなるキャピラリー内に液体および液体試料を送液し、前記液体試料を分析するキャピラリー分析装置であって、前記送液は、前記液体および液体試料に電圧を印加して行い、前記分析は、該液体試料成分中、または、液体試料中成分と液体中の構成成分との反応生成物に励起光を照射して、キャピラリー内の部分的な温度変化に伴う物理量変化を測定する光熱変換分析法により行う、ことを特徴とするキャピラリー分析装置。

【請求項3】 前記物理量変化が屈折率変化であり、前記屈折率変化により形成される熱レンズに検出用の光を入射させ、前記熱レンズにより生じる検出用の光の変化を測定することを特徴とする請求項1または2に記載のキャピラリー分析装置。

【請求項4】 該キャピラリーの断面のほぼ全体に熱レンズが形成される集光度の励起光を用いた請求項1～3に記載のキャピラリー分析装置。

【請求項5】 前記液体試料が生物学的材料に由来する液体試料であることを特徴とする請求項1から4のいずれかに記載のキャピラリー分析装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、簡便な微量試料の分析、検出に関わる。

【0002】

【従来の技術】医療診断に必要な測定を患者近傍で行うベッドサイド診断や、河川や廃棄物中の有害物質分析を測定対象側で行うこと、さらには食品の調理、収穫、輸入現場における汚染検査など、point of care (POC) の分析、検出法、装置の開発が重要となってきた。こうしたPOC分析においては、安価で簡便かつ短時間での測定法が求められる。

【0003】微量試料の分析、検出には、従来から、キャピラリーガスクロマトグラフィー (CGC)、キャピラリー液体クロマトグラフィー (CLC) 等で分離質量分析計で検出するGCMS, LCMSが広く用いられてきた。しかしながら、GCMS, LCMSは、検出器の質量分析計が大きく、患者のベッドサイドや、汚染河川や廃棄物処理場近辺などの、測定現場でPOC的に用

いるには困難が伴う。さらに、医療診断用途などでは、血液等の患者由来の検体が触れることもあり、ディスプレイにすることが望ましい。

【0004】これらの問題点を解決するために、10センチから数センチ角程度以下のガラス等のチップ表面に溝を刻んで、その溝での分離、反応を利用して、微量試料の分析を行う μ TAS (microもしくはminiaturized total analysis system) の研究が進められている。(A. Manzt. al., Adv. Chromatogr., Vol. 33, 1-66, 1993, H. Beckert. al., Sci. Prog., Vol. 79, No. 1, 49-63, 1996、特開平2-245655)

μ TASでは、検体量、検出に必要な試薬量、検出に用いた消耗品等の廃棄物、廃液の量がいずれも少なくなる上、検出に必要な時間もおおむね短時間で済むという利点がある。キャピラリー内を流れる試料の分析方法には、蛍光分光法 (例えばS. C. Jakobson, et. al., Anal. Chem. Vol. 66, 4127-4132, 1994、特開平2-245655)、吸光度法 (例えばN. Kuroda, et. al., J. Chromatogr., Vol. 798, 325-334, 1998)、化学発光法 (例えばM. F. Regehr, et. al., J. Capillary Electrophor., Vol. 3, 117-124, 1996) などが一般的である。

【0005】上記のうち、化学発光法、蛍光法は、被検出物質が酸化剤などの触媒の存在により励起状態の化合物となり、この状態から、基底状態になるときのエネルギー (蛍光法の場合は励起化合物と共存するエネルギー受容体にエネルギーをトランスファーし、この受容体の励起状態から基底状態へ移る時のエネルギー) が光として放出されるのを検出するものである。一方、吸光度法は、被検出物質を含む溶液に光を入射し透過光強度を測定し、その入射光強度に対する透過光強度の比を求めるものである。感度的には一般に吸光度法、蛍光法、化学発光法の順に高感度といわれる。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】チップを用いた分析方法での検出方法についての課題は以下のような点が挙げられる。

【0007】主な、化学発光反応としては、ルミノール、ルシゲニンなどによる方法が古くから知られている。化学発光反応は迅速で高感度である。また、検出は光源を必要としないなどの利点を有するが、発光の減衰が急速であり、試薬が不安定、バックグラウンドが高いなどの欠点を有する。さらに、装置が高価で、大きさも吸光度に比べて大型という欠点があり、POC的に用いるには問題がある。

【0008】蛍光法も同様に反応系が古くから知られている利点はあるが、光学系として励起光源、励起光と蛍光を分離する光学フィルターなどが必要となる。これら発光現象を利用する方法では、放射される光が四方に発散するため受光効率が良くなく、また、蛍光法の場合蛍光を発する収率が低いなど、微量試料の検出を行う場合の欠点を有する。

【0009】吸光度法は、原理的に検出するのが入射光と透過光の比であるため、高精度の結果を得るためには光路長を長くとる必要があり、キャピラリーに垂直に光をあてるのではなく、流れ方向に光を当てる工夫もされているが（例えば、特開平8-304339）、平面チップ上のキャピラリーの場合、流れ方向の検出は容易ではなく、長光路を得るため検出セルの構造が複雑となる欠点を有する。

【0010】微量成分の別の検出法として、励起光で液体中の試料を励起していわゆる熱レンズを形成させ、プローブ光でその熱レンズの変化を検出する光熱変換法（熱レンズ法）が以前から知られている（特開昭60-174933、A. C. Boccara et. al., Appl. Phys. Lett. 36, 130, 1980）。光熱変換法では、励起光により0.1 μm ~1 mm程度の厚みの熱レンズを形成させる。光路長が十分長く、たとえば1 cm程度、取れる場合には、光熱変換法は、吸光度法や蛍光法に比べて、励起光とプローブ光の通常2種の光源が必要なことから、光熱変換法は一般には用いられていない。

【0011】一方、チップ中の液体の移動には、チップ外の送液ポンプまたは吸引ポンプを用いて、チップ中キャピラリー内の送液を行う方法が一般的であるが（例えばS. Shoji, et. al., Sensors & Actuators B8, 205-208, 1994）、送液の制御に物理的なバルブを用いる必要があり、制御の即応性、連続的な変化、耐久性、医療現場などでは重要な静粛性、等の点で問題がある。また、送液、吸引ポンプのため装置全体が大きくなることや、チップと外部ポンプとの接続部分での漏れの恐れ、さらにはチップ外部に設ける廃液溜や試薬溶液、緩衝液溜等の点でも問題がある。さらに問題となるのは、ポンプ等による送液では、キャピラリー断面で、キャピラリー中心から壁面方向に向かって速度分布が生じることである。この速度分布により、複数液の混合を例にとると、キャピラリー中心と壁面近傍で混合が実施されてからの時間に違いが発生することになる。

【0012】チップ中で、キャピラリー電気泳動そのものや、電気浸透流を用いて電圧をかけることによって送液する方法も提案されている。（WO96/04547

MartinEnergySystems//Caliper, S. C. Jakobson, et. al., Anal. Chem. Vol. 66, 4127-413

2, 1994）電気泳動とは、荷電した粒子、イオン、または分子を分離及び分析する方法の一つである。電気泳動によって分離する方法は、電圧を印加され電場がかけられた媒体における、検体中の個々の成分の異なる移動速度に基づいている。また、電気浸透流とは、キャピラリー内面の表面に出ている素材由来のイオン（ガラスの場合はケイ酸のプロトンなど）や、内面表面に沈着したキャピラリー内の液体中のイオンが、印加された電界に従って移動する際に、そのイオンの移動力によってキャピラリー内の液体そのものを移動させることをいう。電気浸透流の場合、ポンプ等の駆動力で液送りとする場合と違い、液移動の駆動力がキャピラリー壁面より発生するため、キャピラリー断面方向での流速分布ができていく。電気泳動または電気浸透流により流量を制御したチップでの、検出は蛍光法（WO96/04547 MartinEnergySystems//Caliper）が一般的である。しかしながらこの方法では、安定した電気浸透流を得るため流路断面積は小さくしなければならない。汎用性が高く、検出に通常用いられる吸光度では、流路の断面積が小さくなると、感度が低すぎて実用的ではない。前述特許で用いている蛍光検出でも感度は低く、また蛍光物質しか計れないので汎用性に乏しい。

【0013】一方、He-NeレーザーとArレーザーを用いて光熱変換法（熱レンズ法）での検出を、溝が刻まれたガラスからなるチップに適用した例もある。

（ふんせきNo. 4, 280-284, 1997, M. Harada, et. al., Anal. Chem. Vol. 65, 2938-2940, 1993、川西、他日本分析化学会第44年会講演要旨集p119, 1995）しかし、この方法では、送液制御がチップ外の送液ポンプとバルブによって行われるため、流量制御の精度及び即応性、装置の静粛性の点で改善の余地がある。それだけで無く、前述のポンプで送ることによるキャピラリー断面方向での流速の違いによって、液混合後の反応等の進行の違い、すなわち断面方向で反応開始からの時間の分布が発生し、酵素等を利用する生体由来物質の検出などに使用されるレートアッセイ法など反応開始からの時間に応じた反応生成物を定量検出する手法には、原理上使用できない、もしくは高精度での検出には向かない。また、送液ポンプのつなぎ込み部分など、検出装置全体が大きく、複雑、かつ液漏れなど故障の原因になる点で問題がある。

【0014】また、熱レンズ法は、微小空間の物質を検出する汎用法であるが、分子数を最低いくつから検出できるかという絶対感度を高めるため、励起光を顕微鏡レンズなどで絞って、試料溶液に集光し、形成される熱レンズの厚みを小さくしている。例えば、従来の熱レンズ法のうち、川西他による「ガラス基板上のマイクロチャネルと顕微熱レンズ分光法を用いた集積化液相化学分析

システムの開発 (I)」（日本分析化学会第44年会講演要旨集p119, 1995）では、顕微鏡の倍率を70倍にすることにより焦点付近での励起光のビーム径は約4 μ mになり、倍率を280倍にすれば励起光のビーム径をサブミクロンにまで絞ることができると記載されている。

【0015】しかしながら、このような従来の熱レンズ法では、試料溶液一定体積あたりの物質定量という濃度感度が低い。診断や環境分析などでは絶対感度ではなく、濃度感度が高いことが重要である。

【0016】本発明はこれらの課題を解決するために成されたものであり、その目的とするところは、即応的で、高精度かつ連続的な変化も可能な流量制御が行え、耐久性、静粛性が高く、かつキャピラリーチップ（溝が刻まれたチップ）中の流路に、光路長を長く取るための複雑な構造を作ることなく、また、安価な小型の光学系の検出装置で、微量成分を分析できる分析装置を提供することにある。

【0017】

【課題を解決するための手段】前述した問題点を解決する本発明に係る分析装置は、1) キャピラリー中の液体試料及び試薬溶液の流量制御を電気的手段、電気浸透流及び/または電気泳動、により行い、2) キャピラリー（溝）を流れる液体中の検出対象を光熱変換法で検出することを特徴としている。即ち本発明は、溝内の液体に電界を印加することによって送液を行う装置であって、溝内の液体試料に励起光を照射し、液体試料の部分的な温度変化に伴う物理量変化を計測することを特徴とする光熱変換分析装置を提供する。さらにいえば、溝内の液体に電界を印加することによって送液を行う装置であって、一對の板状部材を備え、少なくとも一方の板状部材の表面に液体が流れる溝が形成され、これら板状部材が溝を内側にして張り合わされて成るキャピラリー内の液体試料に、励起光を照射し、液体試料の部分的な温度変化に伴う物理量変化を計測することを特徴とする光熱変換分析装置を提供する。

【0018】さらに、本発明者らは 従来の熱レンズとは異なり、励起光の集光度を下げて、安定した電気浸透流を得る流路断面積程度に熱レンズを広げることにより、濃度感度を上げ、安定した電気浸透流が可能な小断面のキャピラリーで 感度高く物質を検出できることを見出した。

【0019】本発明に係る分析装置は、溝の刻まれた板状部材で作成され、電気浸透流及び/または電気泳動のための電極を備えたチップと、光熱変換法による検出システム（励起光、プローブ光の光源と、光量変化検出器、演算装置など）をその内部に有する検出装置からなり、該チップに検体を入れて、該検出装置にそのチップを装着して、該チップ内で分離、反応等を起こさせた後に、該検出装置の検出システムを用いて、検出対象物質

を光熱変換法で検出する。

【0020】電圧を印加して送液する電気泳動や電気浸透流では、電圧の制御により、送液を細かく即応的に、また、設定したプログラムに従って複雑な流量変化を制御できる。チップ内での反応や分離を、精度良く制御するために、電気浸透流の採用は好ましい実施態様の一つである。さらに、液の流れは原理的にキャピラリー断面方向で速度の違いの無い層流になるためポンプによる送液では高精度測定に問題があった、酵素等を利用する生体由来物質の検出などに使用されるレートアッセイ法など、反応開始からの時間に応じた反応生成物を定量検出する手法も可能となる。また、ポンプでは流れの中心部が凸になる層流ができ、熱レンズではこの凸部の先端と根本部での物質濃度の違いを検出する場合があるが、電気浸透流を用いることにより検出流体はフラットな層流となるので、安定した検出が可能であることも本発明の特徴として挙げられる。

【0021】本発明に係る、溝が刻まれた平板、もしくはチップ、は分析に必要な成型精度を出すことが必要である。溝の寸法は幅1~2000 μ m、深さ0.1~500 μ mの範囲であることが好ましい。ガラスなどの表面を、RIE等の方法によってウェットまたはドライ条件下でエッチングしても得られる。(D. J. Harrison, et. al., Anal. Chem., Vol. 66, 177-184, 1994. シリコンのエッチングについては、A. Manz, et. al., trends in analytical chemistry, Vol. 10, 144-149, 1991など) Pyrex ガラス、石英ガラスなど清浄な表面をレジストで被覆し、溝パターンの付いたホトマスクをかぶせて露光後、RIE等の方法でエッチングする。得られた溝含有平板に、他の平板（被せ平板）を張り合わせてチップができる。あるいは、2枚の平板表面に上述のようにして溝を刻み、溝を内側にして、2枚の固体の溝が一致するようにして、キャピラリーを形成するようにしてチップを作成しても良い。ただし、溝を一方の固体にのみ刻んで平板を張り合わせる方法に比べて、2枚の溝含有平板を張り合わせる方法は、溝の位置合わせが容易ではない。溝含有平板に張り合わせる平板（被せ平板）の材質は、一般には、ガラスなどが用いられるが別の材質でも構わない。張り合わせ手段には接着剤や、熱による直接張付け法 (D. J. Harrison, et. al., Anal. Chem., Vol. 66, 177-184, 1994) などがある。

【0022】この被せ平板には、空気抜きのための小穴や、液の導入、導出孔があいていてもよい。また、溝含有平板の、溝と反対側の面に、液の導入、導出孔があいていてもよい。これらの孔は、ドリルなどの機械的方法、もしくはサンドブラスト法などの加工技術によりあけることができる。

【0023】導入、導出孔には液ため（試薬、検体、緩衝液、廃液などをいれる）のための高さ1～5mm径1～5mm程度の円筒を接着する。溝含有平板の溝と反対側の面に導入導出孔を開けた場合はこの孔が液ための役も兼ねることができる。

【0024】また、本発明のチップの構造は、加工生産性の点からは、少なくとも一方の板状部材は表面に液体が流れる溝を有する平板と、他の平板を、該平板状装置の溝を内側にして張り合わせてつくられる一対の板状部材からなる構造をとることが好ましいが、貫通溝をもつ平板を、他の平板2枚で挟んで溝を形成させて3枚構成とすることも可能である。

【0025】チップ材料として有機ポリマーを用いることも可能である。この場合の有機ポリマーは、光熱変換検出に用いられる波長の光に対して透明性を有する樹脂である。光熱変換検出で使用する励起及び検出のレーザの波長で透過率が80%以上好ましくは90%以上のものが良好に使用できる。励起及び検出のレーザの波長を考慮すると、一般的には400nm～800nm好ましくは600nm～800nmの波長範囲で、ASTM D1003で測定した光線透過率が80%以上好ましくは90%以上のものが良好に使用できる。

【0026】また平板に溝加工する際の加工性も重要な要素である。加工性の面から良好に使用できるのは、一般の溶融加工可能な熱可塑性樹脂やUV硬化によって得られた樹脂が上げられる。さらに良好に使用できるのは、表面に溝を有する平板を大量に且つ安価に加工成形出来る溶融加工可能な熱可塑性樹脂であり、この中でも非結晶性熱可塑性樹脂、非結晶性樹脂が主成分の熱可塑性ポリマーアロイ、あるいは結晶化度が低い一部の結晶性熱可塑性樹脂である。以上の光の透過性と加工性を満足し特に良好に使用できるのは、具体的には、ポリスチレン、スチレン-アクリロニトリル共重合体等のスチレン系樹脂、ポリメチルメタクリレート、メチルメタクリレート-スチレン共重合体等のメタクリル樹脂、ポリカーボネート、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリエーテルイミド、ポリアリレート、ポリメチルペンテン等である。

【0027】1, 3-シクロヘキサジエン系重合体も好適に用いられる。ホモポリマーとして使用することも可能であるが、共重合体として用いる場合は、1, 3-ブタジエン、イソプレン、1, 3-ペンタジエン、1, 3-ヘキサジエン等の鎖状共役ジエン系モノマー、スチレン、 α -メチルスチレン、p-メチルスチレン、1, 3-ジメチルスチレン、ビニルナフタレン、ビニルスチレン等のビニル芳香族系モノマー、メタクリル酸メチル、アクリル酸メチル、アクリロニトリル、メチルビニルケトン、 α -シアノアクリル酸メチル等の極性ビニルモノマー若しくはエチレンオキシド、プロピレンオキシド、環状エチレン、環状プロピレン、環状シロキサン等の極性

モノマー、またはエチレン、 α -オレフィン系モノマーとの共重合体が挙げられる。この場合の共重合比は重量比で1, 3-シクロヘキサジエンモノマー/コモノマー=75/25～100/0が好ましい。紫外光透過性の高いシクロヘキサジエン系ポリマーについては特願平9-277045中に詳細に記述されている。該ポリマーは、素材として、200nm以上の波長の吸収はほとんどなく、また、非晶性のC-Hポリマーなので、短波長の光源による検出も可能である。

【0028】本発明の表面に液体が流れる微細な溝を有する有機ポリマー製の平板は、板状部材からの切削加工やレーザー等によるエッチング加工、型内でのモノマーやマクロモノマーのUV硬化や熱硬化、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工等の方法により成形できる。良好に使用できる成形加工法は、表面に溝を有する平板を大量に且つ安価に成形加工出来ることから、熱可塑性樹脂の溶融加工や塑性加工である。さらに良好に使用できるのは、金型を用いた熱可塑性樹脂の射出成形法及び/又は圧縮成形法、エンボス成形法である。特に、樹脂の金型キャビティへの充填工程中に、金型に接する樹脂表面の固化温度を低下させつつ射出成形する射出成形法（本願人による特開平10-128783、特願平10-50719）は、生産性良く成形精度の高い微細な溝を有する有機ポリマー製の平板を作ることが出来る。この射出成形方法の具体例としては、キャビティ内に炭酸ガスを満たしておき射出成形する方法が上げられる。この場合の炭酸ガスの圧力は、10MPa以下が好ましい。

【0029】また、成形直前に高周波誘導加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法（特公昭62-58287、米国特許第4439492等に記載）や成形直前に輻射加熱で金型表面を加熱して成形する射出成形方法（成形加工シンポジウム'95, 241<1995>、成形加工'96, 69<1996>、合成樹脂, 42巻(1), 48<1992>等に記載）などの金型表面を加熱して成形する射出成形方法も、金型温度を低く設定し、高周波誘導加熱やハロゲンランプ等の熱源により成形直前に金型表面だけを選択的に加熱して、型表面転写性と成形サイクルの両立をはかれる成形方法であり、本発明の検出装置のチップの製造に好ましい成形方法である。

【0030】本発明の検出装置のチップを、特開平6-283830の回路基板を製造する方法に基づいて製造することも可能である。ガラス基板を使用する場合、ガラス基板上にレジストパターンを形成してサンド・ブラスト法でガラス基板を加工する方法があげられる。厚いレジストで飛来する粒子の方向が垂直方向にそろうため、通常の薄いレジストに比べてシャープな加工が可能で、高アスペクト比の溝を作る事が出来る。また、ガラスや樹脂基板上に感光性レジストを塗布し、溝以外の部分を露光した後、未硬化部分を除去して、溝の形状のレ

ジストパターンを基板上に形成する手法も可能である。

【0031】チップ成形用の金型は、鉄又は鉄を主成分とする鋼材、アルミニウム、又はアルミニウムを主成分とする合金、亜鉛合金、ベリリウム-銅合金等の一般に合成樹脂の成形に使用されている金属金型が良好に使用できる。

【0032】金型作製方法の1つの例を挙げると、まず、金属、プラスチック、シリコン又はガラス等の材料からの切削加工やエッチング加工、又は紫外線硬化樹脂のフォトリソグラフィ加工等の方法により、目的とする微細な溝を有する有機ポリマー製の平板の表面形状を有する母型を1つ作成し、この母型からニッケル等の電気化学的鍍造法により作製される。また前述の特開平6-283830のレジストパターンを形成する方法を用いて金型を作ることも可能である。金属基板にレジストパターンを形成した後、レジストの無い部分を金属メッキで埋め、レジストを除去して、基板表面に微細なパターンを施した、金属板を形成する。この金属板を金型にして、樹脂や焼結ガラスなどの加工を行う事が可能である。

【0033】本発明の表面に液体が流れる微細な溝を有する有機ポリマー製の平板を有するチップは、溝内面を、ポリエチレングリコールのグラフト重合などで蛋白吸着防止処理をしてもよいし、後述する電気浸透流を送液手段として使う場合は、安定した電気浸透流を発生させる表面処理を行っても良い。

【0034】本発明の表面に液体が流れる微細な溝を有するガラス、もしくは樹脂を基板として用いた装置及びキャピラリー装置は、送液方法として、電気浸透流(E OF)を用いる。その場合は、金属針や金属板や金属箔からなる電極、或いは導電性インクで印刷された電極を、被せ平板や、溝を刻んだ基板表面に設ける。この場合は、溝、及び、溝の端または途中に設けられた液溜(試薬、検体、緩衝液、廃液などを入れる)に接する電極、検出装置と連結できる電極及びそれら電極間のリード線も、チップ内に装備することが好ましい。

【0035】金属針を挿入する場合は径0.1~1mmで平板の溝近傍まで達する長さの白金や銅などの針を適当な支持体等を使用して導入導出孔内に固定する。導電性インクの場合は金、銅、ニッケル、カーボンブラック、グラファイト等の微粒子を含有したインクを、真空蒸着やスパッタ製膜では金や白金を孔内壁全面または一部いずれの場合も深さは平板の溝の近くまで達するように印刷あるいは蒸着する。この際、孔をテーパ状にしておけば平板を傾けることなく内壁に電極を形成することができる。

【0036】また上記電極以外に、チップをはめ込む検出装置内の電源端子と連結するための電極及びそれらの電極間のリード線も導電性インクや真空蒸着、スパッタ

て、エッチングで配線パターンを形成したり、パターン形成した銅箔等を板上に転写あるいは張り付けしても形成できる。いずれの場合でも、高電圧を印加した際の発熱が電気泳動に影響をおよぼさない程度に抑えられるよう材質と大きさを選ぶことが必要である。

【0037】電気泳動は、流路の両端または途中に設けた複数の電極間の電圧を制御し、電荷をもったイオン、原子、分子、粒子を電界に従って移動させる。電気泳動の際に、キャピラリーにアガロースやポリアクリルアミドなどのゲルを充填してもよい。電気泳動をすることにより、検体中の構成成分を、その荷電や大きさによって分離することができる。

【0038】電気浸透流は、キャピラリー内面表面のイオンの移動によってキャピラリー内の液体と一緒に移動するものである。キャピラリーがガラスで形成される場合は、ガラス表面のケイ酸のプロトンなどが移動力となる。

【0039】電気浸透流は理論的に、キャピラリー壁面の材質によると電位と、キャピラリーに印加される電位差に比例する。20℃の水を例に電気浸透流速度を求めると、と電位75mVをもつキャピラリーにおいて100V/cmを印加した場合、電気浸透流の速度は0.5mm/sec強の値が得られる。電気浸透流を発生させる電源には特に特殊な機能は必要ではないが、キャピラリー長によっては1kV以上の電位差を発生させることもありうることを考えると、高電圧(kV以上)の出力が可能であるものが好ましい。さらに、この高電圧電源は直接、もしくはインターフェイスボード等を介して外部のコンピューターにつながり、制御できる機能を持つものが好ましい。それにより電気浸透流を発生させるための電位差の印加タイミング等をプログラム化し、よりきめ細やかな電気浸透流制御を行うことができる。本発明に係る分析装置のチップにおいては、検体は、電気浸透流及び/または電気泳動で精度良く流路制御され、分離や、他の試薬との反応を行ったあと、その流路の下流において光熱変換分析に供せられる。

【0040】精度良く成型されたチップは、微量分析に適する。幅1~2000 μ m、深さ0.1~500 μ m程度のキャピラリーでは、チップ面の上下(角度は必ずしもチップ面に垂直である必要はない)方向での、つまり、液体の流れと垂直または斜め方向での、光路長は溝の深さ程度しか取れないが、光熱変換法を用いれば、この程度の光路長で十分高感度で対象物質の検出が可能である。光熱変換法は、光路長を長く取るための複雑な流路構造を作る必要のない、即ち安価なチップで、また、半導体レーザーとフォトダイオードの組み合わせなど安価で簡単な光学系の検出装置で検出が可能である。

【0041】図1に、光熱変換現象に基づき形成される熱レンズを用いた検出法の原理を示す。レンズにより集光されたレーザー光を試料に照射すると光励起により試

料に含まれる測定対象物より熱が発生し、その熱によりレーザーの焦点付近の屈折率が低下する。熱拡散などの効果により屈折率の空間分布ができる。この領域を通過する光は屈折率の分布により直進せず、光学的にレンズが生じたのと同じ効果を生じさせる。この仮想的なレンズの効果も熱レンズ効果と呼ぶ。例えば、水のように屈折率の温度係数が常温付近で負の物質の場合、凹レンズが生じたのと同じ効果を示す。レンズ効果の強さ(レンズの度)は発生する熱量に比例、すなわち励起した分子の数に比例する。そこで、別のプローブレザー光を照射すると、レンズ効果により、プローブレザー光は本来の光路より拡がったり狭まったりする。このプローブレザー光の変化の大きさから、発熱量、すなわち測定対象物の吸光量を測定でき、測定対象物の定量化が可能となる。原理的に熱レンズは励起レーザー光の焦点付近に形成されるため長い光路長を必要とせず、微小領域内の試料の検出に適する。

【0042】光熱変換法を用いた検出装置としては、検出対象物質が吸収する波長を有し、熱レンズを形成させるのに十分な出力を備えた励起光源がまず必要である。

励起光源は キセノンランプなどから、必要とする波長の光をプリズムを用いて取り出しても良いし、検出対象物質を励起することが可能な波長を有するレーザーでもよい。レーザーとしてはHe-Neレーザー、Arレーザー、炭酸ガスレーザー、ヤグレーザーなども用いられるが、半導体レーザーを用いると、検出装置が小さくなり、POCの用途に適する。プローブ光の光源は、励起光よりも出力は小さくてもよいし、波長は励起光と同じでも違ってても良い。励起光、プローブ光ともにキャピラリー流路中に焦点を結ぶようにするために、集光レンズが必要である。

【0043】熱レンズによるプローブ光の変化は、フォトダイオード、CCDカメラ、光電子倍增管などで捉えられる。フォトダイオードが検出装置の小型化には適している。

【0044】励起光はチョッパー等で1m秒程度のパルス光にされ、そのチョッパーと同調するロックインアンプなどで、プローブ光の変化のみを取り出す。ロックインアンプは、単機能の半導体素子などで簡略化が可能である。また励起光のパルス化は、半導体レーザーを電氣的に変調させてもよい。また、プローブ光の検出の際、一般にはロックインアンプを用いるが、特開平9-229883に開示される暗視野型高熱変換分光分析装置の方法を用いて、遮蔽板でポンプ光およびプローブ光の光軸付近の光束を遮蔽し、熱レンズによって発散されたプローブ光のみを検出する手段をとってもよい。或いは、励起光のパルスに合わせて機能を絞った電気回路などに置き換えてもよい。

【0045】通常の熱レンズ、例えば、日本分析化学会

る顕微熱レンズシステムを、そのまま本発明に係るチップに用いたところ、対象物質の検出感度は必ずしも高いとはいえなかった。すなわち、本発明にかかるチップでは、電気浸透流が安定に形成され、かつ、平板上の溝作成や電極貼り付けなどの加工が比較的容易に行える。熱レンズ検出部溝サイズとしては、幅、深さとも20μm程度以上が好ましいが、一方、先述の顕微熱レンズでは、倍率70倍で励起光のビーム径は約4μmとなり、さらに絶対感度を上げるために、顕微鏡の倍率を上げ、ビーム径をサブミクロンのオーダーまで絞ることが記載されている。本発明者らが、検出部の溝が深さ約50μm、幅約50μmであるチップを用いて、ビーム径4μm程度の励起光で熱レンズ検出を行ったときの検出感度は低かった。

【0046】そこで、集光レンズの開口数を種々検討した結果、0.1程度に落としてビーム径を50μm程度に拡げると、検出感度は改善された。これは、従来の熱レンズが、微小空間の物質の分子数を最低いくつから検出できるかという絶対感度を高めるため、励起光を光学的集光レンズなどで強く絞って、試料溶液に集光し、形成される熱レンズの厚みを小さくしているので、試料溶液一定体積当たりの物質質量という濃度感度が低いためであると考えられる。一方、診断や環境分析等では絶対感度ではなく、濃度感度が高いことが重要であり、従来の熱レンズとは異なり、励起光の集光度を下げて、安定した電気浸透流を得る流路断面程度に熱レンズを拡げることにより、濃度感度を上げ、安定した電気浸透流が可能な小断面のキャピラリーで、感度高く物質を検出できる。

【0047】検出対象物質は、励起光を吸収するものであれば、何でも良いが、検体中の他の物質、特に励起光を吸収するものや、プローブ光を吸収またはプローブ光の波長に蛍光などを持つ物質とは、光熱変換を行うまでに分離しておくことが必要である。励起光を吸収する場合は、励起光を吸収する物質のモル吸光係数が1000から100000程度あることが感度の点で望ましい。

【0048】励起光を吸収しない、或いはわずかししか吸収しない検出対象物質は、検出対象物質を基質とする酵素を用いた反応を組み合わせ、励起光を吸収する物質(可視光の場合は色素)に変換して測定するか、或いは、検出対象物質に対する抗体を用いて、励起光を吸収する物質、若しくは励起光を吸収する物質を反応生成物とする酵素で、その抗体または2次抗体を標識して、直接、若しくは酵素反応の結果生じる励起光を吸収する物質を測定する。

【0049】例えば、検出対象物質として生物学的材料を検出する場合、検出対象物質を基質とする酵素反応を組み合わせ、最終的にN-エチル-N-(3-メチルフェニル)-N'-アセチルエチレンジアミン(EMAE)、N-エチル-N

-(3-メチルフェニル)-N'-スクシニルエチレンジアミン(EMSE)、N-エチル-N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAPS)、N-(3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HDAOS)、N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(HSDA)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メチルアニリン(TOOS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAPS)、N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MAOS)、N,N-ビス(4-スルホプロピル)-3, 5-ジメチルアニリン(MADB)、N,N-ビス(4-スルホプロピル)-3, 5-ジメトキシアニリン(DADB)等と4-アミノアンチピリンの縮合体である励起光を吸収する物質、若しくはビス{4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]-N-n-エチル}アミノ-2, 6-ジメチルフェニル}メタン(Bis-MAPS-C2)、ビス{4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]-N-n-プロピル}アミノ-2, 6-ジメチルフェニル}メタン(Bis-MAPS-C3)、ビス{4-[N-3'-スルホ-n-プロピル]-N-n-ブチル}アミノ-2, 6-ジメチルフェニル}メタン(Bis-MAPS-C4)等の励起光を吸収する物質に変換する事なども可能である。(Aoyama, N. 臨床検査, 41:1014(1997))

これら反応をチップ内で行う際に、反応試薬溶液はチップの外から、チューブや針を用いて供給してもよい。或いは、チップ内にビニル袋(材質はポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエステル、ナイロン、塩化ビニルなどで、反応試薬と相互作用しないものならよい)に封入した反応試薬溶液をセットしておき、チップ内の針をチップ外から押しつけるなどして該袋を破って、チップ内の反応試薬溜を満たしてもよい。さらには、反応試薬を乾燥固体としてチップ内に封入しておき、チップ内または外の水または緩衝液溜から水または緩衝液を反応試薬固体封入場所に所定容積導入して、所定の濃度の反応試薬とする方法などがある。

【0050】検体はそのままチップに入れても良いし、河川の汚濁分析や尿分析などでは前処理として、分子量で分画可能な膜フィルターなどを用いて濃縮してもよい。また、チップ上にフィルターを設け、検体中のゴミや、血球などを除去してからキャピラリーに導いても良い。

【0051】本発明に係る分析装置を用いて、医療現場でベッドサイド診断や、外来患者が受診当日にその日の検査結果を知らせ、その結果に基づく治療薬、治療方法の選択が行える。また、河川の汚濁、廃棄物中の有害物質の定量的分析等も、汚染現場で行える。さらに

は、輸入食品の通関時の汚染検査や、調理現場での即時的な分析も可能となる。検出対象物質は、化学物質、蛋白、核酸など特に問わないが、環境汚染化学物質、血液・髄液・唾液や尿中に含まれる生体成分、臓器・組織・粘膜由来の生体成分、感染源となる菌やウイルスなどの蛋白、DNA、RNA、アレルゲン、種々の抗原等が対象となりうる。

【0052】

【発明の実施の形態】本発明の一実施例として、標準血清(脂質測定用、協和メディックス社)を検体溶液とし、トータルコレステロール検出キット(以下検出キットと略する。コレステロールE-HAテストワコー(和光純薬(株)社)中の2種類の検出反応試薬溶液を用い、計3種類の溶液の反応を流量制御で行った例を示す。送液は電圧の印加による電気浸透流で行った。

【0053】(電気浸透流チップを含む「分析装置」の作製。)まずガラス基板上に溝を成形する。この平板は縦12cm、横8cm、厚み3mmで図2に示す様なパターン(溝が形成されている。液だめのための直径2mmの貫通孔が4カ所ありそれぞれ、液だめ1は検体用、液だめ2は試薬1用、液だめ3は試薬2用、液だめ4は廃棄用である。液だめ1には血球分離フィルターが装着されており、検体(全血)を滴下すると検出を妨害する血球が除かれ、血漿がキャピラリーに送られる。溝の大きさは溝1幅15 μ m 深さ30 μ m 長さ1cm、溝2幅200 μ m 深さ30 μ m 長さ1cm、溝3幅203 μ m 深さ30 μ m 長さ3cm、溝4幅100 μ m 深さ30 μ m 長さ4cm、溝5幅303 μ m 深さ30 μ m 長さ5cmである(溝4との合流点から検出部までの長さ)。平板に平板と同寸法で厚さ0.3mmのガラスの被せ板を直接張付け法で張り合わせキャピラリーを形成する。つぎに被せ板の反対側(貫通孔のある側)に銅粒子を含んだ導電性インクで配線と液だめ用電極及び検出装置内の電源端子接続用電極を印刷して電気泳動チップを完成する(図3)。液だめはチップを傾けることなく内壁に印刷可能なようにテーパ形状で形成しておく。図4は図3のa-a'の断面図である。検出装置には液だめ1から4に所定の電圧を印加できるような電源装置が装備され、また図3の11の位置で光熱変換法による検出ができるよう検出器が装備されており、さらに検出データから測定結果を計算しアウトプットするプリンターも備えている。

(電気浸透流を発生、制御するための装置)電気浸透流を発生させる電源として、実施例では30kVまで出力可能な高電圧電源(Model HCZE-30PNO、25、松定プレジジョン)を外部のコンピューターで制御し行った。その際、高電圧電源の出力制御はインターフェイスボード(DAQ Card-1200、1200CB-50コネクターブロック、ナショナルインスツルメント)を介して行い、ソフトウェア(NI-DAQD

ライブソフトウェア、LabVIEW)により電圧の印加タイミング等のプログラムを作製した。

(標準血清の調製。)協和メディックス社脂質測定用標準血清の調製法を一部改変して調製した。具体的には、1バイアルの凍結乾燥品を付属の標準血清溶解液851 μ lを用い溶解し、計算値でトータルコレステロールが800mg/dlになるように調製し、ストック溶液とした。次にストック溶液を付属の標準血清溶液で希釈し、計算値で200mg/dl及び50mg/dlのトータルコレステロールを含む溶液を調製した。

(検出キットの調製。)HAテストワコーコレステロールE-HAテストワコー(和光純薬工業(株)社)を用い、付属のプロトコールに従った。即ち、まず酵素剤A 1びんを酵素剤A 溶解液1びんで溶解し、同様にして酵素剤B 1びんを酵素剤B 溶解液1びんで溶解し調製した。

(トータルコレステロールの検出。)液だめ4に緩衝液を約200 μ l滴下し、キャピラリー全体が緩衝液で満たされた後、液だめ2に試薬1を約200 μ l、液だめ3に試薬2を約200 μ l、液だめ1に検体を約200 μ l滴下する。液だめ4に対して液だめ1～3の電極に100Vを印加し、液だめ1～3から液だめ4へ電気浸透流を発生させる。このとき各溝における流量は溝5で0.9nl/min、溝6で60nl/min、溝7で60.9nl/min、溝8で30nl/min、溝9で90.9nl/minとなる。検体と試薬1との反応時間は3分必要だが、検体が試薬と混合され溝を進む間で反応が完結するようあらかじめ設定しておく。検体と試薬2との反応も同様に5分必要だが、溝通過中に反応が完結するようあらかじめ設定しておく。いずれの場合も流路の長さ及び印加電圧の調整により設定が可能である。反応が終了した検体は図3の検出部11で後述のレーザー励起波長633nm、検出波長750nmの光熱変換法により検出される。

【0054】流路容積の補正が必要な場合はチップ内の検体の液だめの近くに標準サンプル用の液だめを準備しておき、検体の測定前または後に標準サンプルを試薬1、2とともに送液・反応し検出して補正する。

【0055】(光熱変換検出系の構成)使用した光熱変換原理に基づく検出系を図5に示す。顕微鏡にはステージ上での試料の取り扱いの容易さを勘案し倒立型顕微鏡(IX70、Olympus製)を使用した。これは別に落射型の顕微鏡であっても構わない。この顕微鏡は、顕微鏡外の光学系で同軸にされたレーザー光を導入できるよう改造を加えてある。レーザーは励起用にはHe-Neレーザー(633nm、10mW、エドモントサイエンティフィック)を、検出用には半導体レーザー(750nm、INDECO)を使用した。これらレーザーは使用する試薬、生成する反応物の吸収スペクトルにより適当な周波数のものを利用すればよい。またレーザーはガス、固体、半導体などの種類を選ばない。特に半導

体レーザーは装置の小型化の点で好ましい。ミラー、ビームエクパンダー等の光学系はメスグリオ社製品で統一した。励起用のレーザー光はライトチョッパーにより変調された後、ダイクロイックミラーにより検出用レーザーと同軸にされ、顕微鏡に導かれ試料に照射される。試料を照射した後、励起用、検出用で同軸にされていたレーザー光の内、励起光のみ選択的にフィルターにより除去しフォトセンサーに導く。レーザー光受光部分の素子には取り扱いの簡便性を考えファイバー付きのフォトセンサーアンプ(C6386、浜松ホトニクス)を使用した。このフォトセンサー受光部はピンホールを持つカバーで覆われている。フォトセンサー及びセンサーアンプからの出力は低雑音プリアンプ(LI-75A、エヌエフ回路ブロック)で増幅した後、ロックインアンプに導かれ信号処理が行われる。

【0056】本検出系を用いた検出の手順は以下である。図3に示したような、表面に溝パターンを形成してある平板を倒立顕微鏡のステージ上に置く。対物レンズの焦点合わせは励起用レーザーを使用しモニター画面を参照しつつ溝パターンの上辺、下辺の位置での焦点合わせを実施した後、その中間点をもって溝の中心位置とした。焦点合わせを実施した後、上記に詳述したような検体と検出用試薬との反応を行わせ、反応生成物を含む溶液を検出部分に導く。励起用レーザーはライトチョッパーにより1kHzに変調され、溝パターン内反応生成物を励起し発熱過程を生じさせる。このライトチョッパーによる変調の周波数はSN比等の影響により変更することも有り得る。この発熱過程により発生した熱レンズにより検出用レーザーの焦点位置がずれ、それによりピンホールを通してのフォトセンサーの受光量が発熱量に応じ変化する。測定時、試料の流れは停止させても流した状態でも構わないが、本実施例では停止させて測定を行った。フォトセンサーからの信号はロックインアンプにより処理されるがここでは時定数として1秒を用い、ライトチョッパーと同じ周波数1kHzの信号のみ選択的に出力として用いた。ロックインアンプの出力電圧は励起光により励起される反応生成物濃度に比例するため反応生成物の定量化が可能である。

【0057】なお、ビーム径の調整は、異なった開口数を有する対物レンズを交換することで行った。本実施例では、対物レンズを20倍にして、励起光のビーム径を30 μ m程度にして測定を行った。

【0058】本実施例の結果では、800mg/dlと50mg/dlのトータルコレステロールを含む標準血清による5回の測定により検量線を作成し、200mg/dl相当のトータルコレステロールを含む標準血清20回の測定を行ったところCV値3%の値が得られた。以上の結果より、当該「混合分析装置」を用いて検体中のトータルコレステロールを再現よく検出することが出来た。

【0059】検出部溝の幅、深さとも、約 $50\mu\text{m}$ のチップで、同様の測定を行ったところ、対物レンズの開口数が 0.85 （ビーム径約 $1\mu\text{m}$ ）と比べ、 0.1 （ビーム径約 $50\mu\text{m}$ ）の方が検出感度（定量性が確保された最低濃度）が数十倍向上した。

【0060】

【発明の効果】本発明によればマイクロチップのキャピラリー内の被検出物の移送を電気的手段により行うことで、きめ細かい試薬溶液の取り扱いを実現し、さらに検出対象物の定量検出部に微小空間領域内の測定に優れる光熱変換検出法を適用することで、操作性に優れたコンパクトで安価な分析装置を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】光熱変換現象に基づき形成される熱レンズを用いた検出法の原理を示す図である。

【図2】ガラス基板上に形成された溝パターンを示す図

である。

【図3】導電性インクで配線と液だめ用電極及び検出装置内の電源端子接続用電極を印刷して完成されたキャピラリーを含むチップを示す図である。

【図4】図3のa-a'断面図である。

【図5】光熱変換原理に基づく検出系を示す構成図である。

【符号の説明】

1～4 液だめ

5～9 溝

10 合流点

11 配線

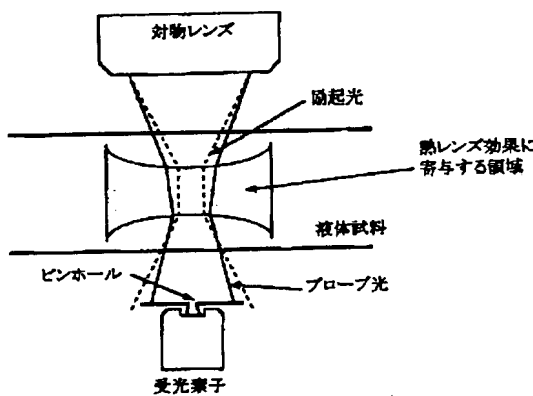
12 検出部

30 電極

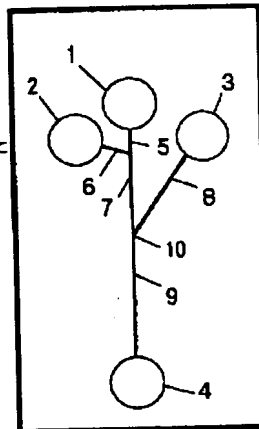
32 被せ板

31 溝含有平板

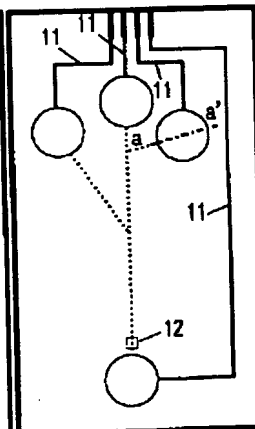
【図1】



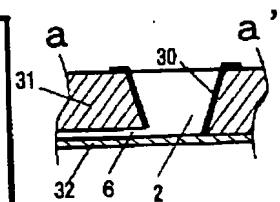
【図2】



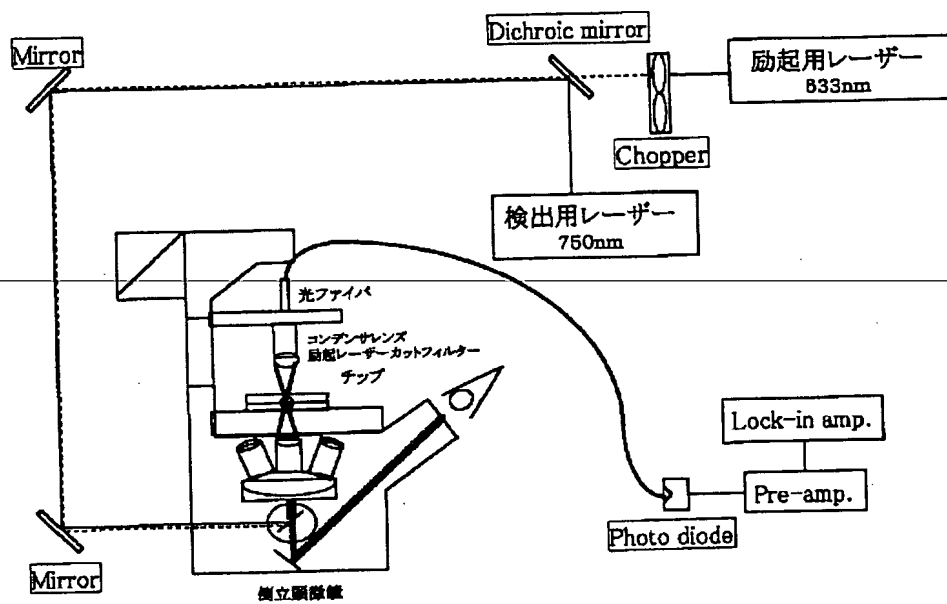
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

Fターム(参考) 2G040 AB07 BA22 BA24 CA12 CA23
 EA06 EA11 EB02 EC04 ZA01
 2G059 AA01 BB04 BB12 CC16 DD12
 EE01 FF03 FF05 GG01 GG07
 JJ03 JJ07 JJ11 JJ13 JJ24
 KK01 MM01 MM05 MM12 MM14